


(19)  **Europäisches Patentamt**
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 0 875 567 A2**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
04.11.1998 Patentblatt 1998/45

(21) Anmeldenummer: **98106426.4**

(22) Anmeldetag: **08.04.1998**

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/12, C07K 14/47,
C12N 15/63, C12N 1/21,
G01N 33/68, C07K 16/18,
A61K 48/00**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: **30.04.1997 DE 19718249**

(71) Anmelder:
**BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)**

(72) Erfinder:

- **Peukert, Karen**
35094 Lahntal-Sterzhausen (DE)
- **Haenel, Frank, Dr.**
07745 Jena (DE)
- **Eilers, Martin, Prof. Dr.**
35043 Marburg-Cappel (DE)

(54) **Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung**

(57) **Neue Myc-bindende Zinkfingerproteine, ihre
Herstellung und ihre Verwendung.**

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung.

Myc ist ein spezifisch an DNA bindendes Protein. Es wird zur Familie der Helix-Loop-Helix/Leucin-Zipper (HLH/LZ) Transkriptionsfaktoren gezählt (Landschulz et al, 1988, Murre et al., 1989). Myc ist ein zentraler Transkriptionsaktivator, der mit dem Protein Max (Amati et al., 1993) einen Komplex bildet und durch diesen molekularen Mechanismus andere Gene aktiviert, beispielsweise alpha-Prothymosin, Ornithindecaboxylase und cdc25A.

Von Schulz et al, 1995, wurde ein 13 Zinkfinger enthaltendes Protein aus der Maus beschrieben, dessen zelluläre Funktion jedoch unklar ist.

Aufgrund seiner Schlüsselstellung in der Transkription bietet Myc einen Ansatzpunkt zum Verständnis von zellulären, insbesondere von pathophysiologischen Prozessen.

Es bestand daher die Aufgabe, weitere Informationen über die molekulare Wirkungsweise von Myc, insbesondere über die Myc vermittelte Genrepression bereitzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz. Dieses Protein besitzt dreizehn Zinkfingerdomänen.

Es weist folgende biologischen Eigenschaften auf:

- Spezifische Bindung an Myc,
- Transaktivierung des Adenovirus Major Late (AdML) Promotors,
- Transaktivierung des Cyclin D1 Promotors,
- durch Assoziation mit Myc wird die Transaktivierung gehemmt,

in Abwesenheit von Myc ist das Protein im wesentlichen im Cytosol assoziiert mit Mikrotubuli zu finden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Proteine, die sich aus der SEQ ID NO:2 dargestellten Struktur durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäuren ableiten lassen, wobei diese Proteine noch die wesentlichen biologischen Eigenschaften des durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Proteins besitzen. Diese Proteine werden im folgenden Muteine genannt. Unter wesentlichen Eigenschaften wird die spezifische Bindung der Muteine an Myc verstanden.

Die oben aufgeführten Eigenschaften des durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Proteins müssen nicht alle bei den Muteinen vorhanden sein, solange die spezifische Bindung an Myc gegeben ist. Bevorzugt sind jedoch diejenigen Muteine, die alle der oben aufgeführten Eigenschaften besitzen.

Die Anzahl der durch Insertion Substitution oder Deletion gegenüber dem durch SEQ ID NO:2 beschriebenen Protein veränderten Aminosäuren kann zwischen 1 und 100, bevorzugt zwischen 1 und 50 Aminosäuren variieren. Die Veränderungen können in einem kleineren Bereich des Moleküls konzentriert oder auch über das ganze Molekül verteilt sein.

Bevorzugte Veränderungen sind konservative Substitutionen, bei denen eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure mit ähnlicher Raumerfüllung, Ladung oder Hydrophilie ersetzt wird.

Beispiele für solche konservativen Substitutionen sind

- Ersatz von Arg durch Lys oder umgekehrt,
- Ersatz von Arg durch His oder umgekehrt,
- Ersatz von Asp durch Glu oder umgekehrt,
- Ersatz von Asn durch Gln oder umgekehrt,
- Ersatz von Cys durch Met oder umgekehrt,
- Ersatz von Cys durch Ser oder umgekehrt,
- Ersatz von Gly durch Ala oder umgekehrt,
- Ersatz von Val durch Leu oder umgekehrt,
- Ersatz von Val durch Ile oder umgekehrt,
- Ersatz von Leu durch Ile oder umgekehrt,
- Ersatz von Phe durch Tyr oder umgekehrt,
- Ersatz von Phe durch Trp oder umgekehrt,
- Ersatz von Ser durch Thr oder umgekehrt.

Die Veränderungen können auch kombiniert werden, z.B. eine oder mehrere Substitutionen mit Deletionen und/oder Insertionen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuresequenzen, die für die oben beschriebenen Proteine codieren. Solche Nukleinsäuresequenzen sind bevorzugt DNA; insbesondere cDNA Sequenzen; in einzelsträngiger oder doppelsträngiger Form.

Bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind solche mit der in SEQ ID NO:1 dargestellten Sequenz und solche, die mit dieser Sequenz einen hohen Verwandtschaftsgrad aufweisen, beispielsweise solche, die für das gleiche Protein codieren wie SEQ ID NO:1. Weitere bevorzugte Nukleinsäuresequenzen sind solche, die für ein Protein codieren, das 95% oder mehr Identität mit dem Protein der Sequenz SEQ ID NO:2 aufweist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vektoren, die eine der oben beschriebenen Nukleinsäuresequenzen in funktioneller Verknüpfung mit einem oder mehreren Regulationselementen tragen. Unter Regulationselemente sind Nukleinsäurefragmente zu verstehen, die auf Transkription oder Translation einen regulierenden Einfluß haben, beispielsweise Promotoren, Enhancer, Polyadenylierungsstellen, ribosomale Bindungsstellen.

Die mit solchen Vektoren transformierten Wirtsorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung. Als Wirtsorganismen geeignet sind Mikroorganismen, pflanzliche oder tierische Zellen oder Lebewesen. Bevorzugte Wirtsorganismen sind eukaryontische Zellen und Lebewesen. Der Begriff Wirtsorganismus umfaßt auch beispielsweise transgene Tiere und Pflanzen.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Proteine erfolgt bevorzugt mit Hilfe gentechnischer Verfahren. Ein Wirtsorganismus, der die Erbinformation für die erfindungsgemäßen Proteine trägt, wird unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des Proteins erlauben. Diese Bedingungen -wie Temperatur, Nährmedium, Zelldichte - hängen weitgehend von der Wahl des Wirtsorganismus ab. Solche Bedingungen sind jedoch dem Fachmann für die einzelnen Wirtsorganismen geläufig.

Die exprimierten Proteine werden anschließend, ggf. nach Aufbrechen des Wirtsorganismus, vom Wirtsorganismus abgetrennt und in reiner Form durch bekannte Methoden der Proteinreinigung, wie Fällung, Chromatographie, Elektrophorese in reiner Form isoliert. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Proteine als Antigen zur Herstellung von Antikörpern, sowie die so erhaltenen Antikörper. Es lassen sich durch dem Fachmann bekannte Verfahren polyklonale Antisera oder auch monoklonale Antikörper herstellen.

Die erfindungsgemäßen Proteine eignen sich auch als Testsysteme zur Auffindung von potentiellen selektiven Transkriptionsmodulierenden Substanzen. Dies läßt sich besonders gut testen, indem man die Fähigkeit der Proteine, mit Myc einen Proteinkomplex zu bilden, ausnützt. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen, das folgende Schritte umfaßt:

(a) Inkubation des Proteins gemäß Anspruch 1 mit dem Genprodukt von myc unter Bedingungen, unter denen sich ein Proteinkomplex zwischen diesen beiden Proteinen ausbildet,

(b) Inkubation der beiden Proteine unter ansonst gleichen Bedingungen wie (a) jedoch in Anwesenheit einer oder mehrerer Substanzen, die auf spezifische transkriptionsmodulierende Aktivitäten zu testen sind,

(c) Ermitteln des Unterschiedes in der Proteinkomplexbildung zwischen (b) und (a),

(d) Auswahl solcher Substanzen, bei denen gemäß Schritt (b) eine andere Proteinkomplexbildung erhalten wurde als bei Schritt (a).

Es lassen sich damit Substanzen auffinden, die die Proteinkomplexbildung zwischen den neuen Zinkfingerprotein und Myc fördern, aber auch solche, die sie unterbinden.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eignen sich auch zur Gentherapie von Erkrankungen, bei denen die durch Myc vermittelte Transkription gestört ist.

Beispielsweise können zusätzliche Gensequenzen eingebracht werden um so die zelluläre Konzentration der Zinkfingerproteine zu erhöhen. Es kann aber auch gewünscht sein, daß die Konzentration der Zinkfingerproteine erniedrigt werden soll. In diesem Falle bietet sich eine Gentherapie auf antisense Basis an, wobei man eine zu dem Zinkfingerproteinen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäurederivat appliziert, und somit die Expression des Zinkfingerproteins reduziert.

Die weitere Ausgestaltung der Erfindung ist in den folgenden Beispielen aufgeführt.

Beispiel 1

Isolierung der DNA mit der durch SEQ ID NO:1 beschriebenen Struktur

Vorausgegangene Arbeiten hatten gezeigt, daß die Integrität der Helix-Loop-Helix Domäne von Myc kritisch für die Genrepression durch Myc in stabilen Zelllinien war (Philipp et al., 1994). Um neue Proteine zu identifizieren, die mit dem C-Terminus von Myc interagieren, wurde ein DNA-Fragment, das für die basische Region und die HLH/LZ Domäne (Aminosäuren 355-439 des humanen Myc) codiert, im Leserahmen an die DNA bindende Domäne von GAL4 (Aminosäure 1-147) fusioniert und als Köder in einem "Two-Hybrid-Screen" (Fields and Song, 1989) benutzt.

2x10⁵ unabhängige Transformanten einer HeLa cDNA Bibliothek, markiert mit der GAL4 Aktivierungsdomäne, wurden gescreent. Ein Clon mit β -Galaktosidaseaktivität wurde weiter charakterisiert. Es wurde keine Interaktion zwischen dem von diesem Clon codierten Protein und der DNA Bindungsdomäne von GAL4 allein oder einer GAL4-BCY-1 Chimäre, die als Negativkontrolle benutzt wurde, festgestellt.

5 Die Interaktion mit Myc wurde aufgehoben durch Deletion der HLH-Domäne in Myc (370-412), nicht aber durch Insertion der vier Aminosäuren zwischen der HLH Domäne und dem Leucin-Zipper (In 412) oder durch Deletion des gesamten Leucin-Zippers (412-434). Eine spezifische Interaktion wurde auch nachgewiesen mit N-Myc aber keine mit MAX oder USF, zwei HLH-Proteinen, die mit Myc nahe verwandt sind.

10 cDNA-Moleküle mit voller Länge wurden durch ein 5'-RACE-Protokoll isoliert und sequenziert (SEQ ID NO:1). Sie codieren ein Protein mit 803 Aminosäuren (SEQ ID NO:2) mit einem theoretischen Molekulargewicht von 87,970 Dalton. Das Protein wurde Miz-1 für Myc-Interacting-Zincfinger-Protein-1 genannt.

Die Sequenzierung ergab, daß der isolierte Clon für ein Zinkfingerprotein mit 13 Zinkfingern codierte, 12 davon unmittelbar geclustert in der C-terminalen Hälfte des Proteins.

15 Beispiel 2

Herstellung von Muteinen

20 Ausgehend von der in SEQ ID NO:1 dargestellten Nukleinsäuresequenz können mit dem Fachmann geläufigen Methoden der Gentechnik Nukleinsäuren hergestellt werden, die für veränderte Proteine (Muteine) codieren. Die Herstellung der Muteine selbst erfolgt zweckmäßigerweise durch Expression einer Nukleinsäure in einem geeigneten Wirtsorganismus.

Beispiel 3

25

Assoziation des Proteins SEQ ID NO:2 mit Myc

30 Der C-Terminus des Proteins SEQ ID NO:2 (Aminosäure 269-803) wurde mit der Glutathion-Transferase (GST) (Smith and Johnson, 1988) fusioniert, das GST-Miz-1 Fusionsprotein gereinigt und mit in vitro synthetisiertem, radioaktiv markiertem Myc Protein inkubiert. Myc assoziiert spezifisch mit GST-Miz-1, jedoch nicht mit GST. Eine Mutante von Myc, der die HLH Domäne fehlt, konnte nicht mit GST-Miz-1 assoziieren. Radioaktiv markiertes Max interagiert weder mit GST-Miz-1 noch mit GST. Jedoch kann mit Hilfe von Myc Max an GST-Miz-1-Kügelchen in vitro binden, was dafür spricht, daß Miz-1 und Max mit unterschiedlichen Flächen der HLH-Domäne von Myc interagieren.

35 Literaturverzeichnis

- Amati, B., Brooks, M. W., Levy, N., Littlewood, T. D., Evan, G. I., and Land, H. (1993). Oncogenic activity of the c-Myc protein requires dimerization with Max. *Cell* 72, 233-245.
- 40 Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L. (1988). The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764.
- 45 Murre, C., SchonleberMcCaw, P., and Baltimore, D. (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-783.
- Philipp, A., Schneider, A., Väsrik, I., Finke, K., Xiong, Y., Beach, D., Alitalo, K., and Eilers, M. (1994). Repression of Cyclin D1: a Novel Function of MYC. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4032-4043.
- 50 Schulz, T. C., Hopwood, B., Rathjen, P. D., and Wells, J. R. (1995). An unusual arrangement of 13 zinc fingers in the vertebrate gene Z13. *Biochem. J.* 311, 219-224.
- Smith, D. B., and Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- 55

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

- 5 (i) ANMELDER:
 (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
 (B) STRASSE: Carl-Bosch-Strasse 38
 (C) ORT: Ludwigshafen
 (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland
 10 (F) POSTLEITZAHL: D-67056
 (G) TELEPHON: 0621/6048526
 (H) TELEFAX: 0621/6043123
 (I) TELEX: 1762175170
 (ii) ANMELDETITEL: Myc-bindende Zinkfingerproteine
 15 (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2
 (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 20 (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- 25 (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 (A) LÄNGE: 2680 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: Einzel
 30 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS
 (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
 35 (iii) ANTISENSE: NEIN
 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 (B) LAGE: 1..159
 40 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 (B) LAGE: 160..2571
 45 (ix) MERKMALE:
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR
 (B) LAGE: 2572..2680

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

50 GGAGTGGCCGT CCCCGGCCTT CTCGCGGCCG TGATGCACCT CCCTCTGCCG TGGGGTCCGG 60
 GACATGGCAG GTAATGAGCC GGACGAGGGG AGCCAAGCTG GAGTTTACAC AGGCAAACCTG 120

55

EP 0 875 567 A2

	TCAGAAAAGA GTAGCCTGGG CTGTCTGGAA ATCTGAGCC ATG GAC TTT CCC CAG	174
	Met Asp Phe Pro Gln	
	1 5	
5	CAC AGC CAG CAT GTC TTG GAA CAG CTG AAC CAG CAG CGG CAG CTG GGG	222
	His Ser Gln His Val Leu Glu Gln Leu Asn Gln Gln Arg Gln Leu Gly	
	10 15 20	
10	CTT CTC TGT GAC TGC ACC TTT GTG GTG GAC GGT GTT CAC TTT AAG GCT	270
	Leu Leu Cys Asp Cys Thr Phe Val Val Asp Gly Val His Phe Lys Ala	
	25 30 35	
	CAT AAA GCA GTG CTG GCG GCC TGC AGC GAG TAC TTC AAG ATG CTC TTC	318
15	His Lys Ala Val Leu Ala Ala Cys Ser Glu Tyr Phe Lys Met Leu Phe	
	40 45 50	
	GTG GAC CAG AAG GAC GTG GTG CAC CTG GAC ATC AGT AAC GCG GCA GGC	366
20	Val Asp Gln Lys Asp Val Val His Leu Asp Ile Ser Asn Ala Ala Gly	
	55 60 65	
	CTG GGG CAG ATG CTG GAG TTT ATG TAC ACG GCC AAG CTG AGC CTG AGC	414
	Leu Gly Gln Met Leu Glu Phe Met Tyr Thr Ala Lys Leu Ser Leu Ser	
	70 75 80 85	
25	CCT GAG AAC GTG GAT GAT GTG CTG GCC GTG GCC ACT TTC CTC CAA ATG	462
	Pro Glu Asn Val Asp Asp Val Leu Ala Val Ala Thr Phe Leu Gln Met	
	90 95 100	
	CAG GAC ATC ATC ACG GCC TGC CAT GCC CTC AAG TCA CTT GCT GAG CCG	510
30	Gln Asp Ile Ile Thr Ala Cys His Ala Leu Lys Ser Leu Ala Glu Pro	
	105 110 115	
	GCT ACC AGC CCT GGG GGA AAT GCG GAG GCC TTG GCC ACA GAA GGA GGG	558
35	Ala Thr Ser Pro Gly Gly Asn Ala Glu Ala Leu Ala Thr Glu Gly Gly	
	120 125 130	
	GAC AAG AGA GCC AAA GAG GAG AAG GTG GCC ACC AGC ACG CTG AGC AGG	606
	Asp Lys Arg Ala Lys Glu Glu Lys Val Ala Thr Ser Thr Leu Ser Arg	
	135 140 145	
40	CTG GAG CAG GCA GGA CGC AGC ACA CCC ATA GGC CCC AGC AGG GAC CTC	654
	Leu Glu Gln Ala Gly Arg Ser Thr Pro Ile Gly Pro Ser Arg Asp Leu	
	150 155 160 165	
45	AAG GAG GAG CGC GGC GGT CAG GCC CAG AGT GCG GCC AGC GGT GCA GAG	702
	Lys Glu Glu Arg Gly Gly Gln Ala Gln Ser Ala Ala Ser Gly Ala Glu	
	170 175 180	
	CAG ACA GAG AAA GCC GAT GCG CCC CGG GAG CCG CCG CCT GTG GAG CTC	750
50	Gln Thr Glu Lys Ala Asp Ala Pro Arg Glu Pro Pro Pro Val Glu Leu	
	185 190 195	

55

EP 0 875 567 A2

	AAG CCA GAC CCC ACG AGT GGC ATG GCT GCC GCA GAA GCT GAG GCC GCT	798
	Lys Pro Asp Pro Thr Ser Gly Met Ala Ala Ala Glu Ala Glu Ala Ala	
	200 205 210	
5	TTG TCC GAG AGC TCG GAG CAA GAA ATG GAG GTG GAG CCC GCC CGG AAA	846
	Leu Ser Glu Ser Ser Glu Gln Glu Met Glu Val Glu Pro Ala Arg Lys	
	215 220 225	
10	GGG GAA GAG GAG CAA AAG GAG CAA GAG GAG CAA GAG GAG GAG GGC GCA	894
	Gly Glu Glu Glu Gln Lys Glu Gln Glu Glu Gln Glu Glu Glu Gly Ala	
	230 235 240 245	
15	GGG CCA GCT GAG GTC AAG GAG GAG GGT TCC CAG CTG GAG AAC GGA GAG	942
	Gly Pro Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Ser Gln Leu Glu Asn Gly Glu	
	250 255 260	
20	GCC CCC GAG GAG AAC GAG AAT GAG GAG TCA GCG GGC ACA GAC TCG GGG	990
	Ala Pro Glu Glu Asn Glu Asn Glu Glu Ser Ala Gly Thr Asp Ser Gly	
	265 270 275	
25	CAG GAG CTC GGC TCC GAG GCC CGG GGC CTG CGC TCA GGC ACC TAC GGC	1038
	Gln Glu Leu Gly Ser Glu Ala Arg Gly Leu Arg Ser Gly Thr Tyr Gly	
	280 285 290	
30	GAC CGC ACG GAG TCC AAG GCC TAC GGC TCC GTC ATC CAC AAG TGC GAG	1086
	Asp Arg Thr Glu Ser Lys Ala Tyr Gly Ser Val Ile His Lys Cys Glu	
	295 300 305	
35	GAC TGT GGG AAG GAG TTC ACG CAC ACG GGG AAC TTC AAG CGG CAC ATC	1134
	Asp Cys Gly Lys Glu Phe Thr His Thr Gly Asn Phe Lys Arg His Ile	
	310 315 320 325	
40	CGC ATC CAC ACG GGG GAG AAG CCC TTC TCG TGC CGG GAG TGC AGC AAG	1182
	Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Glu Cys Ser Lys	
	330 335 340	
45	GCC TTT TCC GAC CCG GCC GCG TGC AAG GCC CAT GAG AAG ACG CAC AGC	1230
	Ala Phe Ser Asp Pro Ala Ala Cys Lys Ala His Glu Lys Thr His Ser	
	345 350 355	
50	CCT CTG AAG CCC TAC GGC TGC GAG GAG TGC GGG AAG AGC TAC CGC CTC	1278
	Pro Leu Lys Pro Tyr Gly Cys Glu Glu Cys Gly Lys Ser Tyr Arg Leu	
	360 365 370	
55	ATC AGC CTG CTG AAC CTG CAC AAG AAG CGG CAC TCG GGC GAG GCG CGC	1326
	Ile Ser Leu Leu Asn Leu His Lys Lys Arg His Ser Gly Glu Ala Arg	
	375 380 385	
60	TAC CGC TGC GAG GAC TGC GGC AAG CTC TTC ACC ACC TCG GGC AAC CTC	1374
	Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Leu Phe Thr Thr Ser Gly Asn Leu	
	390 395 400 405	

EP 0 875 567 A2

	AAG CGC CAC CAG CTG GTG CAC AGC GGC GAG AAG CCC TAC CAG TGC GAC	1422
	Lys Arg His Gln Leu Val His Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp	
	410 415 420	
5	TAC TGC GGC CGC TCC TTC TCC GAC CCC ACT TCC AAG ATG CGC CAC CTG	1470
	Tyr Cys Gly Arg Ser Phe Ser Asp Pro Thr Ser Lys Met Arg His Leu	
	425 430 435	
10	GAG ACC CAC GAC ACG GAC AAG GAG CAC AAG TGC CCA CAC TGC GAC AAG	1518
	Glu Thr His Asp Thr Asp Lys Glu His Lys Cys Pro His Cys Asp Lys	
	440 445 450	
15	AAG TTC AAC CAG GTA GGG AAC CTG AAG GCC CAC CTG AAG ATC CAC ATC	1566
	Lys Phe Asn Gln Val Gly Asn Leu Lys Ala His Leu Lys Ile His Ile	
	455 460 465	
20	GCT GAC GGG CCC CTC AAG TGC CGA GAG TGT GGG AAG CAG TTC ACC ACC	1614
	Ala Asp Gly Pro Leu Lys Cys Arg Glu Cys Gly Lys Gln Phe Thr Thr	
	470 475 480 485	
	TCA GGG AAC CTG AAG CGG CAA CTT CGG ATC CAC AGC GGG GAG AAG CCC	1662
	Ser Gly Asn Leu Lys Arg Gln Leu Arg Ile His Ser Gly Glu Lys Pro	
	490 495 500	
25	TAC GTG TGC ATC CAC TGC CAG CGA CAG TTT GCA GAC CCC GGC GCT CTG	1710
	Tyr Val Cys Ile His Cys Gln Arg Gln Phe Ala Asp Pro Gly Ala Leu	
	505 510 515	
30	CAG CGG CAC GTC CGC ATT CAC ACA GGT GAG AAG CCA TGC CAG TGT GTG	1758
	Gln Arg His Val Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Cys Gln Cys Val	
	520 525 530	
35	ATG TGC GGT AAG GCC TTC ACC CAG GCC AGC TCC CTC ATC GCC CAC GTG	1806
	Met Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ala Ser Ser Leu Ile Ala His Val	
	535 540 545	
40	CGC CAG CAC ACC GGG GAG AAG CCC TAC GTC TGC GAG CGC TGC GGC AAG	1854
	Arg Gln His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys Glu Arg Cys Gly Lys	
	550 555 560 565	
	AGA TTC GTC CAG TCC AGC CAG TTG GCC AAT CAT ATT CGC CAC CAC GAC	1902
	Arg Phe Val Gln Ser Ser Gln Leu Ala Asn His Ile Arg His His Asp	
	570 575 580	
45	AAC ATC CGC CCA CAC AAG TGC AGC GTG TGC AGC AAG GCC TTC GTG AAC	1950
	Asn Ile Arg Pro His Lys Cys Ser Val Cys Ser Lys Ala Phe Val Asn	
	585 590 595	
50	GTG GGG GAC CTG TCC AAG CAC ATC ATC ATT CAC ACT GGA GAG AAG CCT	1998
	Val Gly Asp Leu Ser Lys His Ile Ile Ile His Thr Gly Glu Lys Pro	
	600 605 610	

55

EP 0 875 567 A2

5
TAC CTG TGT GAT AAG TGT GGG CGT GGC TTC AAC CGG GTA GAC AAC CTG 2046
Tyr Leu Cys Asp Lys Cys Gly Arg Gly Phe Asn Arg Val Asp Asn Leu
615 620 625

10
CGC TCC CAC GTG AAG ACC GTG CAC CAG GGC AAG GCA GGC ATC AAG ATC 2094
Arg Ser His Val Lys Thr Val His Gln Gly Lys Ala Gly Ile Lys Ile
630 635 640 645

15
CTG GAG CCC GAG GAG GGC AGT GAG GTC AGC GTG GTC ACT GTG GAT GAC 2142
Leu Glu Pro Glu Glu Gly Ser Glu Val Ser Val Val Thr Val Asp Asp
650 655 660

20
ATG GTC ACG CTG GCT ACC GAG GCA CTG GCA GCG ACA GCC GTC ACT CAG 2190
Met Val Thr Leu Ala Thr Glu Ala Leu Ala Ala Thr Ala Val Thr Gln
665 670 675

25
CTC ACA GTG GTG CCG GTG GGA GCT GCA GTG ACA GCC GAT GAG ACG GAA 2238
Leu Thr Val Val Pro Val Gly Ala Ala Val Thr Ala Asp Glu Thr Glu
680 685 690

30
GTC CTG AAG GCC GAG ATC AGC AAA GCT GTG AAG CAA GTG CAG GAA GAA 2286
Val Leu Lys Ala Glu Ile Ser Lys Ala Val Lys Gln Val Gln Glu Glu
695 700 705

35
GAC CCC AAC ACT CAC ATC CTC TAC GCC TGT GAC TCC TGT GGG GAC AAG 2334
Asp Pro Asn Thr His Ile Leu Tyr Ala Cys Asp Ser Cys Gly Asp Lys
710 715 720 725

40
TTT CTG GAT GCC AAC AGC CTG GCT CAG CAT GTG CGA ATC CAC ACA GCC 2382
Phe Leu Asp Ala Asn Ser Leu Ala Gln His Val Arg Ile His Thr Ala
730 735 740

45
CAG GCA CTG GTC ATG TTC CAG ACA GAC GCG GAC TTC TAT CAG CAG TAT 2430
Gln Ala Leu Val Met Phe Gln Thr Asp Ala Asp Phe Tyr Gln Gln Tyr
745 750 755

50
GGG CCA GGT GGC ACG TGG CCT GCC GGG CAG GTG CTG CAG GCT GGG GAG 2478
Gly Pro Gly Gly Thr Trp Pro Ala Gly Gln Val Leu Gln Ala Gly Glu
760 765 770

55
CTG GTC TTC CGC CCT CGC GAC GGG GCT GAG GGC CAG CCC GCA CTG GCA 2526
Leu Val Phe Arg Pro Arg Asp Gly Ala Glu Gly Gln Pro Ala Leu Ala
775 780 785

60
GAG ACC TCC CCT ACA CCT CCT GAA TGT CCC CCG CCT GCC GAG TGAGCTGGCG 2578
Glu Thr Ser Pro Thr Pro Pro Glu Cys Pro Pro Pro Ala Glu
790 795 800

65
GCCCTTCTGA CTGTTTATTT AAGGATGGAT GGCACCTGG AACCGGAAG GGTGGCCTGT 2638

70
TCCCTAGAGA GAATAAATTG GATTATTTTC TAAAAA AAAA AA 2680

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 803 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

10 Met Asp Phe Pro Gln His Ser Gln His Val Leu Glu Gln Leu Asn Gln
 1 5 10 15
 15 Gln Arg Gln Leu Gly Leu Leu Cys Asp Cys Thr Phe Val Val Asp Gly
 20 25 30
 15 Val His Phe Lys Ala His Lys Ala Val Leu Ala Ala Cys Ser Glu Tyr
 35 40 45
 20 Phe Lys Met Leu Phe Val Asp Gln Lys Asp Val Val His Leu Asp Ile
 50 55 60
 Ser Asn Ala Ala Gly Leu Gly Gln Met Leu Glu Phe Met Tyr Thr Ala
 65 70 75 80
 25 Lys Leu Ser Leu Ser Pro Glu Asn Val Asp Asp Val Leu Ala Val Ala
 85 90 95
 Thr Phe Leu Gln Met Gln Asp Ile Ile Thr Ala Cys His Ala Leu Lys
 100 105 110
 30 Ser Leu Ala Glu Pro Ala Thr Ser Pro Gly Gly Asn Ala Glu Ala Leu
 115 120 125
 Ala Thr Glu Gly Gly Asp Lys Arg Ala Lys Glu Glu Lys Val Ala Thr
 130 135 140
 35 Ser Thr Leu Ser Arg Leu Glu Gln Ala Gly Arg Ser Thr Pro Ile Gly
 145 150 155 160
 40 Pro Ser Arg Asp Leu Lys Glu Glu Arg Gly Gly Gln Ala Gln Ser Ala
 165 170 175
 Ala Ser Gly Ala Glu Gln Thr Glu Lys Ala Asp Ala Pro Arg Glu Pro
 180 185 190
 45 Pro Pro Val Glu Leu Lys Pro Asp Pro Thr Ser Gly Met Ala Ala Ala
 195 200 205
 Glu Ala Glu Ala Ala Leu Ser Glu Ser Ser Glu Gln Glu Met Glu Val
 210 215 220
 50 Glu Pro Ala Arg Lys Gly Glu Glu Glu Gln Lys Glu Gln Glu Glu Gln
 225 230 235 240

55

EP 0 875 567 A2

	Glu Glu Glu Gly Ala Gly Pro Ala Glu Val Lys Glu Glu Gly Ser Gln	
	245	250 255
5	Leu Glu Asn Gly Glu Ala Pro Glu Glu Asn Glu Asn Glu Glu Ser Ala	
	260	265 270
	Gly Thr Asp Ser Gly Gln Glu Leu Gly Ser Glu Ala Arg Gly Leu Arg	
	275	280 285
10	Ser Gly Thr Tyr Gly Asp Arg Thr Glu Ser Lys Ala Tyr Gly Ser Val	
	290	295 300
	Ile His Lys Cys Glu Asp Cys Gly Lys Glu Phe Thr His Thr Gly Asn	
15	305	310 315 320
	Phe Lys Arg His Ile Arg Ile His Thr Gly Glu Lys Pro Phe Ser Cys	
	325	330 335
20	Arg Glu Cys Ser Lys Ala Phe Ser Asp Pro Ala Ala Cys Lys Ala His	
	340	345 350
	Glu Lys Thr His Ser Pro Leu Lys Pro Tyr Gly Cys Glu Glu Cys Gly	
	355	360 365
25	Lys Ser Tyr Arg Leu Ile Ser Leu Leu Asn Leu His Lys Lys Arg His	
	370	375 380
	Ser Gly Glu Ala Arg Tyr Arg Cys Glu Asp Cys Gly Lys Leu Phe Thr	
30	385	390 395 400
	Thr Ser Gly Asn Leu Lys Arg His Gln Leu Val His Ser Gly Glu Lys	
	405	410 415
35	Pro Tyr Gln Cys Asp Tyr Cys Gly Arg Ser Phe Ser Asp Pro Thr Ser	
	420	425 430
	Lys Met Arg His Leu Glu Thr His Asp Thr Asp Lys Glu His Lys Cys	
	435	440 445
40	Pro His Cys Asp Lys Lys Phe Asn Gln Val Gly Asn Leu Lys Ala His	
	450	455 460
	Leu Lys Ile His Ile Ala Asp Gly Pro Leu Lys Cys Arg Glu Cys Gly	
	465	470 475 480
45	Lys Gln Phe Thr Thr Ser Gly Asn Leu Lys Arg Gln Leu Arg Ile His	
	485	490 495
	Ser Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys Ile His Cys Gln Arg Gln Phe Ala	
50	500	505 510
	Asp Pro Gly Ala Leu Gln Arg His Val Arg Ile His Thr Gly Glu Lys	
	515	520 525

55

EP 0 875 567 A2

Pro Cys Gln Cys Val Met Cys Gly Lys Ala Phe Thr Gln Ala Ser Ser
530 535 540

5 Leu Ile Ala His Val Arg Gln His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Val Cys
545 550 555 560

Glu Arg Cys Gly Lys Arg Phe Val Gln Ser Ser Gln Leu Ala Asn His
565 570 575

10 Ile Arg His His Asp Asn Ile Arg Pro His Lys Cys Ser Val Cys Ser
580 585 590

Lys Ala Phe Val Asn Val Gly Asp Leu Ser Lys His Ile Ile Ile His
595 600 605

15 Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Leu Cys Asp Lys Cys Gly Arg Gly Phe Asn
610 615 620

20 Arg Val Asp Asn Leu Arg Ser His Val Lys Thr Val His Gln Gly Lys
625 630 635 640

Ala Gly Ile Lys Ile Leu Glu Pro Glu Glu Gly Ser Glu Val Ser Val
645 650 655

25 Val Thr Val Asp Asp Met Val Thr Leu Ala Thr Glu Ala Leu Ala Ala
660 665 670

Thr Ala Val Thr Gln Leu Thr Val Val Pro Val Gly Ala Ala Val Thr
675 680 685

30 Ala Asp Glu Thr Glu Val Leu Lys Ala Glu Ile Ser Lys Ala Val Lys
690 695 700

Gln Val Gln Glu Glu Asp Pro Asn Thr His Ile Leu Tyr Ala Cys Asp
705 710 715 720

Ser Cys Gly Asp Lys Phe Leu Asp Ala Asn Ser Leu Ala Gln His Val
725 730 735

40 Arg Ile His Thr Ala Gln Ala Leu Val Met Phe Gln Thr Asp Ala Asp
740 745 750

Phe Tyr Gln Gln Tyr Gly Pro Gly Gly Thr Trp Pro Ala Gly Gln Val
755 760 765

45 Leu Gln Ala Gly Glu Leu Val Phe Arg Pro Arg Asp Gly Ala Glu Gly
770 775 780

Gln Pro Ala Leu Ala Glu Thr Ser Pro Thr Pro Pro Glu Cys Pro Pro
785 790 795 800

50 Pro Ala Glu

55

Patentansprüche

1. Isoliertes Protein mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Aminosäuresequenz sowie die daraus durch Substitution, Insertion oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäureresten erhältlichen Muteine, die noch die wesentlichen biologischen Eigenschaften des in SEQ ID NO:2 dargestellten Proteins besitzen.
2. Protein gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein humanes Protein handelt.
3. Nukleinsäuresequenz codierend für ein Protein gemäß Anspruch 1.
4. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie für ein Protein codiert, das mindestens 95 % Identität mit der in SEQ ID NO:2 dargestellten Sequenz besitzt.
5. Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO:1 dargestellte Struktur besitzt.
6. Vektor enthaltend eine Nukleinsäuresequenz gemäß Anspruch 3 - 5, funktionell verknüpft mit mindestens einem Regulationselement.
7. Wirtsorganismus, transformiert mit einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3.
8. Wirtsorganismus, transformiert mit einem Vektor gemäß Anspruch 6.
9. Verfahren zur Herstellung eines Proteins gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Wirtsorganismus gemäß Anspruch 6 unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des Proteins erlauben und anschließend das exprimierte Protein vom Wirtsorganismus abtrennt und in reiner Form isoliert.
10. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1 zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen.
11. Verfahren zur Identifizierung von spezifischen transkriptionsmodulierenden Substanzen, das folgende Schritte umfaßt:
 - (a) Inkubation des Proteins gemäß Anspruch 1 mit dem Genprodukt von myc unter Bedingungen, unter denen sich ein Proteinkomplex zwischen diesen beiden Proteinen ausbildet,
 - (b) Inkubation der beiden Proteine unter ansonst gleichen Bedingungen wie (a) jedoch in Anwesenheit einer oder mehrerer Substanzen, die auf spezifische transkriptionsmodulierende Aktivitäten zu testen sind,
 - (c) Ermitteln des Unterschiedes in der Proteinkomplexbildung zwischen (b) und (a),
 - (d) Auswahl solcher Substanzen, bei denen gemäß Schritt (b) eine andere Proteinkomplexbildung erhalten wurde als bei Schritt (a).
12. Verwendung eines Proteins gemäß Anspruch 1 als Antigen zur Herstellung von spezifischen Antikörpern.
13. Verwendung einer Nukleinsäuresequenz nach Anspruch 3 zur Gentherapie.
14. Verwendung einer zu der Sequenz gemäß Anspruch 3 komplementären Nukleinsäuresequenz zur Gentherapie.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß man durch die exogen zugeführte Nukleinsäuresequenz die zelluläre Konzentration des Proteins gemäß Anspruch 1 erhöht oder erniedrigt.

(19)



Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 0 875 567 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
22.12.1999 Patentblatt 1999/51

(43) Veröffentlichungstag A2:
04.11.1998 Patentblatt 1998/45

(21) Anmeldenummer: 98106426.4

(22) Anmeldetag: 08.04.1998

(51) Int. Cl.⁶: **C12N 15/12**, C07K 14/47,
C12N 15/63, C12N 1/21,
G01N 33/68, C07K 16/18,
A61K 48/00

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 30.04.1997 DE 19718249

(71) Anmelder:
BASF AKTIENGESELLSCHAFT
67056 Ludwigshafen (DE)

(72) Erfinder:
• **Peukert, Karen**
35094 Lahntal-Sterzhausen (DE)
• **Haenel, Frank, Dr.**
07745 Jena (DE)
• **Eilers, Martin, Prof. Dr.**
35043 Marburg-Cappel (DE)

(54) **Myc-bindende Zinkfinger-Proteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung**

(57) Myc-bindende Zinkfingerproteine, ihre Herstellung und ihre Verwendung.

EP 0 875 567 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 98 10 6426

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
D, X	THOMAS C. SCHULZ ET AL.: "An unusual arrangement of 13 zinc fingers in the vertebrate gene Z13" BIOCHEMICAL JOURNAL, Bd. 311, Nr. 1, 1. Oktober 1995 (1995-10-01), Seiten 219-224, XP002117525 * das ganze Dokument *	1-3, 6-10, 12-15	C12N15/12 C07K14/47 C12N15/63 C12N1/21 G01N33/68 C07K16/18 A61K48/00
X	N. TOMMERUP ET AL.: "Isolation and fine mapping of 16 novel human zinc finger-encoding cDNAs identify putative candidate genes for developmental and malignant disorders" GENOMICS, Bd. 27, Nr. 2, 20. Mai 1995 (1995-05-20), Seiten 259-264, XP002117526 * Zusammenfassung; Tabelle 1 * -& R59u022 Datenbank Hs20647 Zugriffsnummer U20647; 6 März 1995 TOMMRUP N. ET AL.: "Human zinc finger protein (ZNF151) mRNA, partial cds." XP002117530 --- -/-	1-3, 6-10, 12-15	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6) C12N C07K G01N A61K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Die Recherchenabteilung ist der Auffassung, daß ein oder mehrere Ansprüche, den Vorschriften des EPU in einem solchen Umfang nicht entspricht bzw. entsprechen, daß sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik für diese Ansprüche nicht, bzw. nur teilweise, möglich sind.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Unvollständig recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Nicht recherchierte Patentansprüche:</p> <p>Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Obwohl die Ansprüche 12-15 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen (Artikel 52(4) EPÜ), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 5. Oktober 1999	Prüfer Montero Lopez, B
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		<p>T: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</p>	
<p>X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: nichtschriftliche Offenbarung P: Zwischenliteratur</p>			

EPO FORM 1503 (03.82) (P04C09)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER
TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 98 10 6426

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.6)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	
D,A	ANGELIKA PHILIPP ET AL.: "Repression of Cyclin D1: a novel function of MYC" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Bd. 14, Nr. 6, Juni 1994 (1994-06), Seiten 4032-4043, XP002117527 * Zusammenfassung * * Seite 4039, linke Spalte, Absatz 2 - Seite 4041, rechte Spalte, letzter Absatz *	1-15	
P,X	PEUKERT K ET AL: "An alternative pathway for gene regulation by Myc." EMBO JOURNAL, (1997 SEP 15) 16 (18) 5672-86. , XP002117528 * das ganze Dokument *	1-15	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.6)
P,X	SCHNEIDER A ET AL: "Association of Myc with the zinc-finger protein Miz -1 defines a novel pathway for gene regulation by Myc." CURRENT TOPICS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, (1997) 224 137-46. , XP002117529 * das ganze Dokument *	1-15	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.